

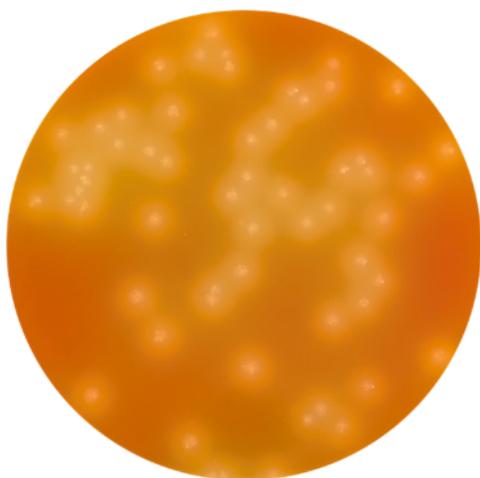


LACTOSE EGG-YOLK NEOMYCIN AGAR (LENA) BASE

LACTOSE EGG YOLK NEOMYCIN AGAR (LENA)

NEOMYCIN ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

Terreno di coltura in polvere, supplemento selettivo e terreno pronto all'uso in piastra



Lactose Egg-Yolk Neomycin Agar: *Clostridium perfringens*

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per la determinazione di *Clostridium perfringens* negli alimenti, in accordo alla norma ISO 15213-3.

2 – COMPOSIZIONE *

LACTOSE EGG-YOLK NEOMYCIN AGAR (LENA) BASE - TERRENO IN POLVERE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA

Peptone	10 g
Estratto di carne	10 g
Cloruro di sodio	5 g
Lattosio	10 g
Rosso fenolo	0,1 g
Agar	14 g

LACTOSE EGG-YOLK NEOMYCIN AGAR (LENA) – PIASTRA PRONTE ALL'USO

Peptone	10 g
Estratto di carne	10 g
Cloruro di sodio	5 g
Lattosio	10 g
Rosso fenolo	0,1 g
Agar	14 g
Egg Yolk Emulsion 20%	50 mL
Neomicina solfato	250 mg

NEOMYCIN ANTIMICROBIC SUPPLEMENT (FLACONE PER 500 ML DI TERRENO)

Neomicina solfato	125 mg
-------------------	--------

* Le formule possono essere compensate e/o corrette per adeguare le prestazioni alle specifiche

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

L'intossicazione alimentare causata da *Clostridium perfringens* può verificarsi quando alimenti come carni crude, pollame, zuppe e salse disidratate, verdure crude e spezie vengono cotte e conservate senza essere adeguatamente riscaldate o refrigerate prima di essere servite.¹ La determinazione di *C. perfringens* nei campioni di cibo svolge un ruolo fondamentale nell'indagine epidemiologica dei focolai di malattie di origine alimentare e a questo scopo sono stati proposti diversi terreni di coltura fin dagli anni Cinquanta.

Il terreno Lactose Egg-Yolk Neomycin Agar, affiancato al TSC agar (REF 402158), è indicato per la determinazione di *C. perfringens*, in accordo alla norma ISO 15213-3.²

La miscela di peptoni e l'estratto di carne forniscono carbonio, azoto e oligoelementi necessari per la crescita batterica, il cloruro di sodio garantisce l'equilibrio osmotico, il lattosio è il substrato fermentabile ed il rosso fenolo è l'indicatore di pH per evidenziare la reazione.

Il supplemento Egg Yolk Emulsion 20% (REF 42111205) è l'indicatore di lecitinasi e la neomicina solfato (REF 4240034) è un antibiotico che inibisce la sintesi proteica dei contaminanti, contribuendo all'isolamento selettivo di *C. perfringens*.

4- PREPARAZIONI DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 24,55 g in 500 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino ad ebollizione con frequente agitazione e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 44-47°C ed aggiungere 25 mL di Egg-Yolk Emulsion 20% (REF 42111205) ed il contenuto di una fiala di Neomycin Antimicrobial Supplement (REF 4240034), ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile. Mescolare bene e versare in piastre sterili.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

LENA

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno base in soluzione	rosso, limpido
Aspetto del terreno completo in piastra	rosso-arancio, opalescente
pH (20-25 °C)	7,3 ± 0,2

NEOMYCIN ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

Aspetto del supplemento liofilo	pastiglia bianca
Aspetto del supplemento ricostituito	limpido, incolore

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Lactose Egg-Yolk Neomycin Agar (LENA) Base	Terreno in polvere	4015732	500 g (10,18 L)
Neomycin Antimicrobial Supplement	Supplemento liofilo	4240034	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
Egg Yolk Emulsion 20%	Supplemento liquido	42111205	100 mL
Lactose Egg-Yolk Neomycin Agar	Piastre pronte	541573	2 x 10 piastre ø 90 mm



7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse, tamponi e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, piastre sterili, generatori di atmosfera controllata e giare, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Prodotti destinati al consumo umano ed all'alimentazione animale, campioni ambientali nell'area della produzione e della manipolazione di alimenti e mangimi, campioni della fase di produzione primaria. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili.²

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Determinazione di *C. perfringens* negli alimenti con Lactose Egg-Yolk Neomycin Agar (ISO/TS 15213-3)²

1. Preparare la sospensione iniziale nel caso in cui il prodotto in esame non sia liquido. Aggiungere 1 mL di campione liquido o 1 mL di sospensione iniziale (0,1 g di prodotto) a 9 mL di Rapid Perfringens Medium-RPM (REF 401984) ed incubare per 18 ± 2 ore a 46°C.
2. Portare a temperatura ambiente le piastre, se conservate a basse temperature ed asciugare la superficie se necessario.
3. Seminare 10 µL dell'arricchimento in RPM su piastra di TSC Agar (REF 402158) e 10 µL su piastra di LENA.
4. Incubare in anaerobiosi il TSC Agar a 37°C per 24 h ± 2 h ed il LENA a 46°C 24 h ± 2 h
5. Prelevare 5 colonie tipiche da entrambe le piastre e seminarle su un terreno non selettivo (es. Columbia Blood Agar REF 541136 o un terreno non selettivo altamente nutritivo, come BHI Agar) e incubare in atmosfera anaerobica per 20 h ± 2 ± a 37°C.
6. Procedere con i test di conferma: test della fosfatasi acida (REF 192010) o SIM Agar test (REF402037).

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie.

Su LENA, *C. perfringens* produce colonie gialle a seguito della fermentazione del lattosio, con alone opaco di lecitinasi.

Su TSC Agar, *C. perfringens* produce solitamente colonie nere o grigio-giallo-brune come risultato della riduzione del solfito a solfuro.

Le colonie di *C. perfringens* sono positive al test della fosfatasi acida, o sono positive alla produzione di solfito, negative alla produzione di indolo ed alla mobilità su SIM Agar.

11 – CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi utili per il controllo qualità.²

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	46°C/ 22-26 H / AN	crescita, colonie gialle con alone opaco
<i>E. coli</i> ATCC 25922	46°C/ 22-26 H / AN	totalmente inibito
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	46°C/ 22-26 H / AN	possibile crescita, colonie gialle senza alone di lecitinasi

AN: incubazione in anaerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

12- CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di ogni lotto di LENA Base disidratato addizionato con Neomycin Antimicrobic Supplement ed Egg-Yolk Emulsion 20% e di piastre pronte all'uso di LENA è testato per la produttività, la selettività e la specificità con ceppi target e non target.

La produttività è testata con metodo quantitativo con i ceppi target *C. perfringens* ATCC 13124 e *C. perfringens* ATCC 12916, con incubazione in anaerobiosi a 46°C per 24 ore. I ceppi target mostrano buona crescita con colonie gialle ed alone opaco.

La selettività è testata usando il metodo Miles-Misra modificato con *E. coli* ATCC 25922. Il ceppo è totalmente inibito

La specificità viene testata con la tecnica semiquantitativa ecometrica utilizzando *B. subtilis* ATCC 6633. Il ceppo può sviluppare crescita con colonie gialle senza alone opaco.

13 – LIMITI DEL METODO

- Il terreno è studiato per fornire un ausilio nella determinazione di *Clostridium perfringens*, in affiancamento al terreno TSC Agar.

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura ed i supplementi qui descritti sono destinati al controllo microbiologico e sono per uso professionale; devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno di coltura ed i supplementi devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- I terreni disidratati devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Il supplemento selettivo è classificato come pericoloso. Prima dell'uso, consultare le schede di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni di sicurezza specifiche per i materiali potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web www.biolifeitaliana.it il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Fare attenzione quando si apre l'anello metallico delle fiale per evitare lesioni.
- Il supplemento è sterilizzato mediante filtrazione a membrana.
- Ogni piastra di questo terreno di coltura è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non sono soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto con biocontaminazione controllata, entro i limiti delle specifiche riportate sul Certificato di Controllo di Qualità.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'ambiente di laboratorio con il terreno di coltura, i supplementi ed i ceppi microbici





- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni ed i supplementi non utilizzati ed i terreni inoculati con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e le Schede di Sicurezza sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego dei prodotti, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

15 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Piastre pronte all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Le piastre estratte dal sacchetto di plastica possono essere utilizzate entro 7 giorni. Eliminare se vi sono segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimenti o screpolature del terreno, colore atipico, eccesso di condensa).

Terreno di coltura in polvere

Dopo il ricevimento, conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto è valido sino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (es. modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

Supplemento liofilizzato

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Prima dell'uso esaminare il liofilizzato e il prodotto ricostituito per rilevare segni evidenti di deterioramento (es. contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia e condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento).

Secondo la norma ISO 15213-3², le piastre di terreno LENA preparate in laboratorio possono essere conservate a 2-8 °C per un massimo di 4 settimane ed il terreno di base può essere conservato a 2-8 °C per un massimo di 4 settimane in contenitori o provette chiuse; prima dell'uso, il terreno conservato viene sciolto completamente e raffreddato a 44 °C - 47 °C prima dell'uso.

16- BIBLIOGRAFIA

1. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 16: Clostridium perfringens.
2. ISO/TS 15213-3:2024 Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Clostridium* spp. – Part 3: detection of *Clostridium perfringens*.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	Fabbricante	Utilizzare entro	Proteggere dall'umidità	Fragile, maneggiare con cura
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> test	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Lato superiore	Proteggere dalla luce	Monouso

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 0	Prima pubblicazione	03/2025

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni

